

	サウリョウ
氏名	佐藤 諒
本籍（国籍）	岩手県
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第 747 号
学位授与年月日	平成 31 年 3 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 寒冷圏生命システム学
学位論文題目	タンパク質膜挿入に必須の糖脂質酵素 MPIase の生合成酵素の同定とその機能解析(Identification and functional analysis of biosynthetic enzymes for glycolipozyme MPIase essential for membrane protein integration)
学位審査委員	主査 西山 賢一（岩手） 副査 山下 哲郎（岩手 教授）, 姫野 俵太（弘前 教授）, 豊増 知伸（山形 教授）

論文の内容の要旨

全ての細胞はリン脂質より構成された生体膜により細胞外と隔てられている。生体膜は細胞内外を隔てる障壁であるだけでなく、細胞の構造の維持、情報伝達、エネルギー物質の生産、物質のやり取りといった重要な生命現象を担っている。これらの機能には、膜タンパク質が関与している。膜タンパク質とは、生体膜を貫通して、あるいは、その表面に局在しているタンパク質の総称である。このうち前者を膜内在性タンパク質、後者を膜表在性タンパク質と呼ぶ。リン脂質で構成された生体膜中に存在しているため、膜内在性タンパク質の疎水性は極めて高い。これに対して、タンパク質の翻訳が行われる細胞質は親水的環境である。したがって、膜内在性タンパク質は、タンパク質膜挿入因子の作用により翻訳に共役して膜挿入する。これまでにタンパク質膜挿入反応の分子機構の全容が解明されつつあり、その分子機構は全ての生物において普遍的に保存されている。遺伝学的、生化学的知見の蓄積した大腸菌を用いた研究によると、タンパク質膜挿入経路は、大まかに 2 つの経路に分けられる。1 つ目は、Sec/SRP 依存の経路である。この経路では、リボソームにおける翻訳と共役して膜挿入反応が進行する。翻訳途中の膜タンパク質の膜貫通領域をシグナル認識粒子 SRP が認識し、膜上に存在する SRP 受容体である SR を介して膜へのターゲティングが行われる。その後、タンパク質膜透過チャネル SecYEG 上で膜挿入反応が進行する。2 つ目の経路は、Sec/SRP に依存しない経路である。この経路では、翻訳終了後に膜挿入反応が進行する。分子量の小さい膜タンパク質や C 末端側のみに膜貫通領域が存在する膜タンパク質の場合、SRP が認識する前に翻訳が終了するため、SRP や SecYEG に依存せず膜挿入反応が進行する。いずれの経路においても、MPIase (Membrane Protein Integrase) と命名された糖脂質が必須であることが明らかとなっている。MPIase は、大腸菌内膜に存在する糖脂質である。その構造は、糖鎖とジアシルグリセロール (DAG) がピロリン酸を介して結合している。糖鎖は、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、N-アセチルマンヌロン酸 (ManNAcA)、4-デオキシ-4-アセトアミドフコース

(Fuc4NAc)がそれぞれ 1-4 グリコシド結合した三糖ユニットの繰り返しにより構成される。三糖ユニットは、分子全体で約 10 回繰り返されている。MPIase は、*in vitro* での再構成系を用いた実験によりタンパク質膜挿入因子として同定された。しかし、MPIase が *in vivo* においてもタンパク質膜挿入反応を触媒しているかは不明であった。*In vivo* におけるタンパク質膜挿入への MPIase の関与を調べるためには、MPIase 枯渇株を構築することにより膜挿入反応が阻害されるかを調べる必要がある。しかし、新規化合物である MPIase の生合成に関する知見は全くなかった。MPIase の生合成経路を解明し、そこに関与する因子を同定することを目的として研究を行った。

MPIase 生合成反応を予想し、その反応を触媒する酵素を同定した。予想にあたって、MPIase の構造類縁体である Enterobacterial common antigen (ECA)の生合成経路を参考にした。ECA は、腸内細菌の産生する外膜因子である。ECA は、糖鎖と DAG をその構造の一部に持つ。糖鎖は、MPIase のものと同じ三糖ユニットより構成される。しかし、糖鎖ユニットの繰り返しが 18-55 個と MPIase のものより長く、不均一である点と、糖鎖と DAG のリンカーがピロリン酸ではなくモノリン酸である点が MPIase とは異なる。ECA の生合成反応は一連の *wec* 遺伝子にコードされている。しかし、*wec* 遺伝子欠損株においても MPIase 生合成への影響は全くないことが明らかとなっている。したがって、両者の生合成経路は独立して存在していると考えられる。MPIase 生合成酵素の探索を行った結果、内膜タンパク質 YnbB およびそのホモログ CdsA を同定した。CdsA は CDP-DAG 生合成酵素として知られている。CDP-DAG は、大腸菌においてはすべてのリン脂質の前駆体として利用される。YnbB および CdsA 過剰発現株における MPIase 生合成量を調べると、いずれの株においても MPIase 生合成活性の増加が観察された。また、*ynbB/cdsA* 遺伝子の二重欠損株では、MPIase が枯渇された。以上の結果より、YnbB/CdsA が MPIase 生合成酵素であると結論した。MPIase 生合成第一段階の反応は次のように進行することを明らかにした。CTP とホスファチジン酸より、CDP-DAG が生合成される。CDP-DAG の CMP 部分が GlcNAc-P が置換されることにより、Compound I と命名した中間体が生合成される。この一連の反応は、YnbB/CdsA 上で行われる。この反応の後に糖鎖の伸長、糖鎖長の調節が行われ、MPIase が完成すると考えられる。

続いて、YnbB/CdsA の機能解析を行った。YnbB/CdsA のいずれも MPIase と CDP-DAG 生合成反応を触媒する。しかし、CdsA は生育に必須の因子であるのに対し、YnbB は必須ではない。この違いは、両者の酵素としての特性にあることを明らかにした。MPIase とリン脂質はいずれも生育に必須の因子である。CdsA は MPIase とリン脂質の両方を生育に十分な量生合成する能力があるのに対し、YnbB のリン脂質生合成量は生育には不十分であり、MPIase 生合成に特化している可能性が考えられた。YnbB、CdsA を組み替えたキメラタンパク質を用いた実験によりこの可能性を検証した。これらのタンパク質を *ynbB/cdsA* 二重欠損株に過剰発現させ、MPIase 生合成活性及び CDP-DAG 生合成活性を調べた。その結果、YnbB と CdsA の間で MPIase 生合成活性に大きな差は見られなかった。一方、YnbB の CDP-DAG 生合成活性は CdsA のものより著しく低かった。また、キメラタンパク質を用いた解析により、YnbB および CdsA の C 末端側が MPIase および CDP-DAG 生合成反応における活性部位として機能し、N 末端側が CDP-DAG 生合成活性を促進していることを明らかとした。

本研究では、MPIase の生合成反応を触媒する酵素の同定、機能解析を行った。得られた知見を用いて、タンパク質膜挿入の分子機構の詳細を解明できると期待される。

論文審査の結果の要旨

全ての細胞は生体膜で覆われている。生体膜は細胞内と外部を隔てる障壁であるだけでなく、細胞の構造の維持、物質のやり取り、情報伝達、エネルギー物質の生産といった代謝反応の場としても機能する。生体膜で行われる反応は、膜タンパク質によって触媒される。膜タンパク質は、膜を貫通して、あるいは膜表面に局在するタンパク質の総称である。リン脂質で構成される生体膜中に局在するため、膜貫通型タンパク質の疎水性は極めて強い。これに対して、タンパク質合成が行われる細胞質は親水的である。したがって、膜貫通型タンパク質は不可逆的に凝集しないように膜挿入する必要がある。これまでにタンパク質膜挿入の分子機構は大筋で明らかになっており、Sec/SRP 依存の経路と非依存の経路の 2 種類が知られている。いずれの経路も全ての生物に普遍的に保存されている。遺伝学的知見および生化学的知見の蓄積した大腸菌を用いた研究により、MPIase と命名された糖脂質がタンパク質膜挿入反応に必須であることが明らかとなっている。

MPIase は膜挿入因子を再構成した *in vitro* 実験より膜挿入に必須の因子として同定された。しかし、*in vivo* での膜挿入反応においても必須であるかどうかは不明であった。これを明らかにするためには、MPIase 生合成遺伝子破壊株を構築し、MPIase を欠損した条件で膜挿入が阻害されるかどうかを調べる必要がある。しかし、MPIase が同定された当時、その生合成に関する知見は全くなかった。そのため、MPIase 生合成遺伝子の同定を目的として研究を行った。その結果、MPIase 生合成第一段階の反応を触媒する酵素として内膜タンパク質 YnbB およびそのホモログ CdsA を同定した。CdsA は CDP-ジアシルグリセロール(CDP-DAG)生合成酵素として知られている。CDP-DAG は大腸菌においては全てのリン脂質の生合成前駆体である。したがって、CdsA はリン脂質生合成と MPIase 生合成という 2 つの重要な生命現象に関与することが明らかとなった。

続いて、YnbB/CdsA の機能解析を行った。アミノ酸配列の相同性の高さに加え、YnbB/CdsA はいずれも MPIase と CDP-DAG を生合成するにもかかわらず、YnbB は生育に必須でないのに対し、CdsA は必須であるという違いがある。その原因は両者の酵素としての特性にあると予想し、この可能性を検証した。その結果、CdsA は生育に十分な量の CDP-DAG と MPIase を生合成する能力があるのに対し、YnbB の CDP-DAG 生合成活性は著しく低く、MPIase 生合成に特化した因子であることが明らかになった。

以上のように、本研究でタンパク質膜挿入に必須の因子 MPIase の生合成遺伝子の一部を同定し、その機能解析を行った。本研究で得られた知見より、MPIase 欠損株の構築が可能になり、タンパク質膜挿入の分子機構のさらなる詳細な解析が可能になった。本審査委員会は、岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準に則り審査した結果、本論文を博士（農学）の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

主論文

1. Sato, R., Sawasato, K., and Nishiyama, K. (2019)
YnbB is a CdsA paralogue dedicated to biosynthesis of glycolipid MPIase involved in membrane protein integration
Biochemical and Biophysical Research Communications
510 : 636-642

参考論文

1. Sawasato, K., Sato, R., Nishikawa, H., Iimura, N., Kamemoto, Y., Fujikawa, K., Yamaguchi, T., Kuruma, Y., Tamura, Y., Endo, T., Ueda, T., Shimamoto, K., and Nishiyama, K., (2019)
CdsA is involved in biosynthesis of glycolipid MPIase essential for membrane protein integration *in vivo*
Scientific Reports 9 : Article number 1372